

機関番号：15401

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21780096

研究課題名（和文） 不定形タンパク質による固体表面認識機構の解明と固体表面との界面制御技術の開発

研究課題名（英文） Studies on the solid surface-binding mechanism of an intrinsically disordered protein and development of specific biological/inorganic interfaces

研究代表者

池田 文（IKEDA TAKESHI）

広島大学・大学院先端物質科学研究科・助教

研究者番号：10505754

研究成果の概要（和文）：

シリカ(SiO<sub>2</sub>)に強く結合するタンパク質「Si-tag」は溶液中で特定の立体構造をとらない天然変性タンパク質である。結合機構の解析の結果、柔軟な天然変性ポリペプチド鎖が長い領域に渡って協奏的に働いていることが示唆された。ポリペプチド鎖がほどけているため固体表面との接触面積が大きくなり、より多くのアミノ酸残基が固体表面と相互作用することで結合力が強化されていると考えられた。これらの結果は、天然変性タンパク質が無機固体表面に対する接着分子として有用であることを示唆するものであった。

研究成果の概要（英文）：

The silica-binding protein "Si-tag" belongs to a family of intrinsically disordered (ID) proteins that exist as dynamic ensembles of rapidly fluctuating structures in aqueous solution. Experimental and theoretical studies have shown that the ID regions in Si-tag act in unison to bind strongly to silica surfaces. Si-tag should interact with a large area of the silica surface due to the relatively large number of residues in its extended, disordered regions. Our study suggests that flexible ID proteins have tremendous potential for connecting biomolecules to inorganic materials.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：タンパク質工学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用生物化学

キーワード：天然変性タンパク質、界面、シリカ、シリコン

## 1. 研究開始当初の背景

我々は細菌由来のリボソームタンパク質 L2がシリカ(SiO<sub>2</sub>)表面に強く結合することを発見し「Si-tag」と命名した(Taniguchi et al., Biotechnol. Bioeng. 96, 1023-1029, 2007)。Si-tag との融合タンパク質を作製す

ることで、任意のタンパク質にシリカ結合能を付与することができる。すなわち、Si-tag 融合タンパク質を含む溶液をシリカに接触させるだけで、当該タンパク質は自発的にシリカ表面上に結合する。主要な半導体であるシリコンの表面には絶縁性の酸化膜(SiO<sub>2</sub>)が存在するため、シリコンデバイス上に Si-tag

融合タンパク質を固定化することが可能であり (Ikeda et al., Anal. Biochem. 385, 132-137, 2009)、簡便に半導体バイオ融合デバイスを作製するための技術として有望である。実際に Si-tag を利用してシリコンデバイスとタンパク質を組み合わせたバイオセンサーが開発されている。(Yamatogi et al., Jpn. J. Appl. Phys. 48, 04C188, 2009)

より優れた半導体バイオ融合技術の開発に向けて Si-tag の結合力・結合特異性を改良するためには、結合機構の理解が必須である。Si-tag (273 aa) 中のシリカ結合領域を明らかにするため、Si-tag の欠失変異体を作製し、そのシリカ結合能を比較したところ、Si-tag の N 末端約 60 残基と C 末端約 70 残基が主に結合に関与していることが明らかとなった。結晶化を試みた Nakagawa らの報告によると、これらの領域が存在した場合、タンパク質の結晶化ができなかったことから、これらの領域は特定の立体構造を持たない「天然変性(または不定形)」とよばれる領域であることが示唆されていた (Nakagawa et al., ENBO J. 18, 1459-1467, 1999)。

天然変性タンパク質は、通常タンパク質のような球状の立体構造をとらず、溶液中ではひらひらとしたリボンのような状態で存在している。単独では立体構造をとらないが、特定の結合相手が存在すると、相手との相互作用によりペプチド鎖が折りたたまれ、特定の構造へと変化することが知られている (Dyson & Wright, Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 6, 197-208, 2005)。同じ天然変性領域が、複数の結合相手に対して、異なる構造をとりながら結合する例も報告されており、異なる複数の相手とのフレキシブルな結合が可能な構造といえる。Si-tag とシリカとの結合においても、この天然変性領域が関与していることが予想された。

## 2. 研究の目的

天然変性タンパク質 Si-tag の固体表面への結合機構を明らかにすることで、固体表面とタンパク質の相互作用についての理解を深める。また、得られた知見を基に Si-tag の機能改変を行うことで、より結合力・結合特異性に優れた変異体の作製を図るとともに、タンパク質と無機固体という異質の材料間の界面制御技術の確立を目指す。

## 3. 研究の方法

### (1) 天然変性領域の予測と結合領域の絞り込み

複数の天然変性領域予測プログラムを用いて、Si-tag 中の天然変性領域を予測した。予想された天然変性領域を細分化した各 20

残基のペプチド (11 種類) にそれぞれ *Staphylococcus aureus* 由来プロテイン A を融合したタンパク質を調製した。得られたタンパク質溶液にシリカ粒子を添加し、粒子表面に吸着したタンパク質を SDS-PAGE に供した。CBB 染色後のゲルの画像解析によってタンパク質量を定量することで、各ペプチドのシリカ結合力の評価を行った。

### (2) Si-tag のゼータ電位・粒径測定

Si-tag のアミノ酸配列の解析から、シリカとの結合には静電的な相互作用が関与していることが示唆されたため、溶液中の Si-tag およびシリカ表面のゼータ電位を大塚電子社製ゼータ電位・粒径測定システム ELSZ-2 により測定した。Si-tag については溶液中での粒径測定も行った。

## 4. 研究成果

### (1) 天然変性領域の予測と結合領域の絞り込み

天然変性領域予測プログラムによる解析の結果、Si-tag 中の予測天然変性領域とシリカ結合領域はよく一致することが判明した (図 1)。これらの領域を細分化したペプチドとプロテイン A を融合したタンパク質を調製し、シリカ結合領域の絞り込みを行ったが、明確なシリカ結合領域というものは見出せなかった。これらの結果から、シリカとの結合には特定の結合部位が単独で機能しているのではなく、柔軟な天然変性ポリペプチド鎖が長い領域に渡って協奏的に働いている可能性が示唆された。

また、Si-tag は強力なタンパク質変性剤である尿素 (8 M) 存在下においてもシリカ表面に強く結合することが判明した。一般的な球状タンパク質は変性剤存在では立体構造が崩壊し活性を失うのに対し、Si-tag はもともと変性したような (=天然変性) 状態であるため、変性剤の有無にかかわらずシリカ結合能を発揮できると考えられた。

### (2) Si-tag のゼータ電位・粒径測定

光散乱法によるタンパク質分子の粒径測定の結果、Si-tag は同程度の分子量を有する球状タンパク質に比べ粒径が顕著に大きく、ポリペプチド鎖がほどけた天然変性状態であることが実験的に支持された。また、アミノ酸配列から予想された通り、Si-tag は中性緩衝液中で正のゼータ電位を示した。一方、シリカ表面は溶液中で負に帯電しており、Si-tag は静電的な相互作用によってシリカ表面に吸着することが強く示唆された。特に、Si-tag 中の天然変性領域には正電荷を有するアミノ酸残基が多く存在している。ポリペプチド鎖がほどけているため固体表面との

接触面積が大きくなり、より多くの正電荷アミノ酸が固体表面と相互作用することで結合力が強化されていると考えられた。

### (3) 結合モデルの提唱

上記の成果から得られた知見をまとめて、図2のような結合モデルを提唱した。

一般的な球状タンパク質の場合、まずタンパク質が固体表面に可逆的に吸着する。その後、固体表面との相互作用によってタンパク質の立体構造が徐々に崩壊(変性)する。この変性過程でタンパク質と固体表面との接触面積が増大し、相互作用が強まることで、非可逆的な吸着状態へと移行することが知られている(図2左)。一方、Si-tagのN末端領域とC末端領域は最初から変性状態であるため、速やかに非可逆的な吸着状態となることで強固な結合を実現していると予想された(図2右)。

本研究によって得られた成果は、天然変性タンパク質が無機固体表面に対する接着分子として有用であることを示唆するものであった。Si-tagのアミノ酸配列を改変し、天然変性状態を強めることでさらなる結合力の向上が期待される。

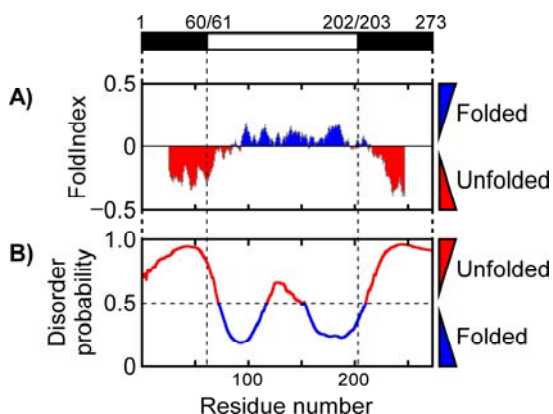


図1. Si-tagの予測天然変性領域  
A) FoldIndex (Prilusky et al., Bioinformatics 21, 3435-3438, 2005)による予測結果。B) P00DLE-L (Hirose et al., Bioinformatics 23, 2046-2053, 2007)による予測結果。予想天然変性領域を赤色で示す。

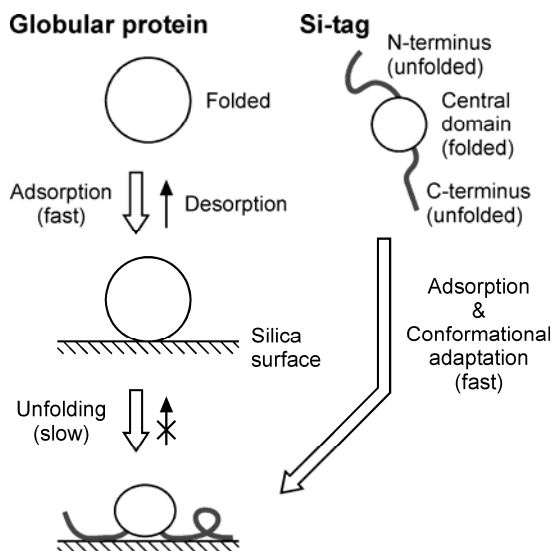


図2. Si-tagの結合メカニズムの概念図

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計3件)

1. Takeshi Ikeda, Akio Kuroda, Why does the silica-binding protein "Si-tag" bind strongly to silica surfaces? Implications of conformational adaptation of the intrinsically disordered polypeptide to solid surfaces, Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 査読有, in press
2. Takeshi Ikeda, Kei Motomura, Yuuya Agou, Takenori Ishida, Ryuichi Hirota, Akio Kuroda, The silica-binding Si-tag functions as an affinity tag even under denaturing conditions, Protein Expression and Purification, 査読有, 77 (2011) 173-177
3. Takeshi Ikeda, Ken-ichi Ninomiya, Ryuichi Hirota, Akio Kuroda, Single-step affinity purification of recombinant proteins using the silica-binding Si-tag as a fusion partner, Protein Expression and Purification, 査読有, 71 (2010) 91-95

[学会発表] (計8件)

1. 池田 丈, 本村 圭, 吾郷 友哉, 廣田 隆一, 黒田 章夫, シリカ結合タンパク質 Si-tag 中の天然変性領域の機能解析, 日本農芸化学会 2011 年度大会 (大会開催は中止となったが、講演要旨集の発行[発行日 2011 年 3 月 5 日]をもって発表は成立)
2. 池田 丈, 本村 圭, 吾郷 友哉, 廣田 隆一, 黒田 章夫, シリカ結合タンパク質 Si-tag 中の天然変性領域の機能解析,

BMB2010 (第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会 合同大会), 2010 年 12 月 7 日, 神戸ポートアイランド

3. 池田 丈, 本村 圭, 阿部 陽介, 雨宮 嘉照, 福山 正隆, 廣田 隆一, 横山 新, 黒田 章夫, シリカ結合タンパク質を用いた半導体バイオ融合デバイス開発, 第 62 回日本生物工学会大会(2010), 2010 年 10 月 29 日, 宮崎シーガイア

4. 本村 圭, 池田 丈, 吾郷 友哉, 廣田 隆一, 黒田 章夫, シリカ結合タンパク質 Si-tag を利用した変性条件下でのアフィニティー精製法の開発第 62 回日本生物工学会大会(2010), 2010 年 10 月 29 日, 宮崎シーガイア

5. 池田 丈, 本村 圭, 阿部 陽介, 雨宮 嘉照, 福山 正隆, 横山 新, 黒田 章夫, シリコン結合タンパク質を用いたシリコン基板上へのタンパク質固定化, 2010 年秋季 第 71 回応用物理学会学術講演会, 2010 年 9 月 16 日, 長崎大学

6. 池田 丈, 西田 瑞恵, 雨宮 嘉照, 福山 正隆, 横山 新, 黒田 章夫, シリコン結合タンパク質 Si-tag を利用した半導体バイオ融合デバイスの開発, 日本農芸化学会 2010 年度大会, 2010 年 3 月 29 日, 東京大学

7. 池田 丈, 黒田 章夫, シリカ結合タンパク質を利用した安価なタンパク質精製法, 広島大学リエゾンフェア 2009 in 広島, 2009 年 11 月 25 日, 広島ガーデンパレス

8. 池田 丈, 黒田 章夫, シリカ結合タンパク質を利用した安価なタンパク質精製法, 広島大学 新技術説明会, 2009 年 5 月 14 日, 科学技術振興機構 JST ホール(東京)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

池田 丈 (IKEDA TAKESHI)

広島大学・大学院先端物質科学研究科・助教

研究者番号 : 1 0 5 0 5 7 5 4

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号 :

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号 :